

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr.med. Hansjürgen Raettig

DIE LOKALE IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM POLIOMYELITISVIRUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Neumann-Schönwetter

aus Berlin

1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr.med. Hansjürgen Raettig

DIE LOKALE IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM POLIOMYELITISVIRUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Neumann-Schönwetter
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n
Referent: Professor Dr.med. Hansjürgen R a e t t i g
Korreferent: Professor Dr.med. Bernhard S c h m i d t



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19.November 1968

Disposition:

A. Einleitung	Seite ...	1
B. Aufgabenstellung	...	4
C. Material und Methoden	...	5
I. Tierversuche	...	5
a) Versuchstiere	...	5
b) Impfstoff	...	6
c) Immunisierung	...	6
d) Infektion	...	7
e) Nachweis neutralisierender Antikörper im Tierversuch	...	7
II. Immunisierungsversuche am Menschen	...	9
a) Selbstversuche	...	9
b) Versuche an Kindern	...	9
D. Ergebnisse	...	10
I. Tierversuche	...	10
II. Antikörper	...	23
III. Immunisierungsversuche am Menschen	...	27
E. Vorteile einer oralen Impfung mit inaktivierten Viren	...	33
F. Zusammenfassung	...	35
G. Literatur	...	37

A. Einleitung

Paul Ehrlich berichtete zum erstenmal 1891 über eine künstliche orale Immunisierung. Er verfütterte an Mäuse die pflanzlichen Gifte Rizin und Abrin in stetig größer werdenden Dosen und konnte dadurch eine Giftfestigkeit erzielen (2,3). 1906 veröffentlichte dann Löffler seine Tierexperimente zur oralen Immunisierung (14). Ihm gelang erstmalig eine Immunisierung auf enteralem Weg gegen eine Salmonelleninfektion. Einer der bedeutendsten Forscher der oralen Immunisation war besredka. Nach seiner Meinung bewirkt eine orale Immunisierung eine lokale Darmimmunität, die den Darm für Keime undurchlässig macht (1). In zahlreichen Tierversuchen ist inzwischen die orale Impfung mit inaktivierten bakteriellen Mikroorganismen mit gutem Erfolg durchgeführt worden (11,16). Auch beim Menschen läßt sich die Morbidität bei verschiedenen bakteriellen Darminfektionen, wie Typhus, Paratyphus, Ruhr und Cholera, durch diese Impfmethode senken (17).

1965 berichtete Raettig über Tierexperimente, die klären sollten, ob auch eine orale Immunisierung mit inaktivierten, enteropathogenen Viren möglich sei (18). Diesen Versuchen lagen bereits tierexperimentelle Ergebnisse zu Grunde, die diese Impfmethode erfolgreich erscheinen ließen. Nach diesen Ergebnissen konnte erwartet werden, daß eine orale Impfung

mit nicht vermehrungsfähigen enteropathogenen Viren nicht nur zu einer Darmresistenz führt, die als lokale Zellimmunität aufgefaßt wird, sondern auch eine humorale Immunität ausbildet.

Raettig untersuchte die Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für den Coli Phagen T_3 als apathogenes Modellvirus (19) und später für das Parapoliomyelitisvirus Columbia-SK (20). Nach oraler Verfütterung der Phagen bzw. der Viren an Mäuse konnten diese bereits nach wenigen Minuten im strömendem Blat nachgewiesen werden.

Raettig widerlegte damit die Ansicht, daß ein vermehrungsfähiges Impfvirus nur nach einem zellulären Infektions- und Vermehrungsprozeß in der Darmwand in die Blutbahn eindringen kann, und daß ein inaktiviertes Antigen nur nach fermentativem Abbau und damit ohne wesentliche spezifische immunisierende Wirkung im Darm resorbiert werden kann (20).

Dies stimmt auch mit den Befunden Volkheimers überein, der in verschiedenen Versuchen zeigen konnte, daß die Schleimhäute des Darmes für ungelöste Teilchen bis zu einer Größe von ca. 65 μ durchlässig sind (30,31). Er nannte diesen Vorgang nach dem Entdecker "Herbst Effekt". Bereits im Jahre 1848 hatte Herbst ähnliche Beobachtungen beschrieben (5).

Nach Volkheimer werden die Korpuskel aus dem Nahrungsbrei durch die Muskeltätigkeit des Darmes in das Stroma der Darm-

Schleimhaut geknetet. Von dort werden sie durch das Lymphgefäßsystem abtransportiert und gelangen schließlich über den Ductus thoracicus in die Blutbahn.

Hoffmann konnte in weiteren Versuchen zeigen, daß nicht nur eine Resorption von inaktivierten Viren im Magen-Darm-Trakt, sondern auch an den Schleimhäuten des Respirationtraktes möglich ist (6).

Auf Grund dieser Ergebnisse prüfte Raettig dann in weiteren Tierversuchen die Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit inaktivierten Viren. Er begann die Versuche mit der Parapoliomyelitis-Infektion der Maus, die durch das Columbia SK Virus von Jungeblut verursacht wird. Nach oraler Infektion erkrankten die Tiere regelmäßig in charakteristischer Weise und starben. Wurden die Mäuse jedoch vorher mit hitzeinaktivierten Columbia SK Viren oral immunisiert, dann zeigte sich, daß sie gegenüber ungeimpften Kontrolltieren deutlich geschützt waren. Auch eine unspezifische orale Immunisierung mit inaktivierten Poliomyelitisviren, wozu Raettig den kommerziellen trivalenten Salk Impfstoff benutzte, war erfolgreich. Die Senkung der Mortalität konnte auch bei dieser Versuchsgruppe statistisch gesichert werden(18).

Schon 1957 versuchten Conolly, Dick und Corkin eine Immunisierung bei Kindern durch orale Gaben von formalininaktivierten Poliomyelitisviren zu erreichen. Bei drei von insgesamt sieben mit Impfstoff behandelten Kindern konnten sie eine Antikörperbildung nachweisen (32).

B. Aufgabenstellung

Nachdem Raettig also eine erhöhte Abwehr des Darmes gegenüber enteropathogenen Virusinfektionen nach spezifischer und unspezifischer oraler Impfung mit nicht vermehrungsfähigen Viren bei Mäusen feststellen konnte (18), sollte in dieser Arbeit versucht werden, ob eine belastbare Immunität auch durch eine rektale Applikation zu erzielen sei, bei der die Schleimhäute des Enddarmes mit Antigen in Kontakt kommen. Ferner wurde eine nasale Impfung durchgeführt. Damit sollte die Frage einer Immunisierung über die Schleimhäute des Respirationstraktes gegen eine orale Virusinfektion geklärt werden.

Da die Güte einer Immunisierung auch abhängig vom Zustand des resorbierenden Gewebes und von der Menge des resorbierten Antigens ist, wurde ferner versucht, mit Hilfe von DMSO eine Verbesserung der Resorption zu erreichen. Die 1866 von Saytzeff synthetisierte Verbindung, die erst seit einer Zufallsbeobachtung von Jacob und Herschler fast hundert Jahre später pharmakologisches Interesse gewann, ist nach Jacob "ein hervorragend verträglicher Resorptionsvermittler, der nicht nur selbst biologische Membranen durchdringt, sondern vor allem auch andere Substanzen mitnimmt" (10). Der Wirkungsmechanismus, der dieser Änderung der Membranpermeabilität zu Grunde liegt, ist bisher unbekannt.

Die hier vorliegenden Versuche sollten prüfen, ob durch einen Zusatz von DMSO zum Impfstoff der Impferfolg verbessert werden kann.

Ausgehend von den Tierversuchen ist schließlich eine Immunisierung beim Menschen durch orale Aufnahme von nicht vermehrungsfähigen Viren versucht worden. Da hierbei eine anschließende Infektionsbelastung, die den Impferfolg einer oralen Impfung allein richtig bewerten kann, sich natürlich von selbst verbietet, war die erreichte Immunität nur in einer Bildung neutralisierender Antikörper nachweisbar.

Material und Methoden

I. Tierversuche

a) Versuchstiere

In den acht zeitlich auseinanderliegenden Versuchen benutzte ich insgesamt 1046 NMRI-Mäuse (Naval Medical Research Institute) beiderlei Geschlechts mit einem Durchschnittsgewicht bei Versuchsbeginn von 8 g. Während der Versuche wurden die Tiere unter gleichen äußeren Bedingungen in Gruppen von je 20 oder 25 Tieren in großen Plastik Käfigen gehalten. Sie erhielten Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser. Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Versuchsbedingungen.

b) Impfstoff

Für die Immunisierung wurde der kommerzielle Salk-Impfstoff der Behringwerke, Marburg, benutzt. Der Impfstoff wurde im Verhältnis 1:1 mit einer physiologischen Na Cl-Lösung verdünnt. Für die Versuche mit DMSO wurde dem Salk-Impfstoff im gleichen Verhältnis eine 30%ige Lösung von DMSO (DOLICUR) zugesetzt, das die Firma Schering A.G., Berlin, zur Verfügung stellte.

c) Immunisierung

In einer Versuchsreihe waren jeweils 7 Gruppen, die nach den verschiedenen Applikationen bzw. dem Zusatz von DMSO zum Impfstoff eingeteilt wurden:

Gruppe	Applikation	DMSO-Zusatz
1.	oral	--
2.	oral	+
3.	nasal	--
4.	nasal	+
5.	rektal	--
6.	rektal	+
7.	-	- (Kontrolle)

Alle Tiere wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen geimpft. Oral wurde den Mäusen mit einer Schlundsonde 0,2 ml des jeweiligen Impfstoffes verabreicht. Rektal wurde mit einer Menge von 0,1 ml geimpft, die mit Hilfe einer Sonde in den Enddarm eingebracht wurde. Die nasal zu immunisierenden Mäuse inhalieren in Rückenlage jeweils zwei der mit einer Injek-

tionskanüle in die Nasenlöcher eingeführten Tropfen des Impfstoffes. Die Tiere waren dabei nicht narkotisiert.

d) Infektion

Fünf Tage nach der letzten Impfstoffgabe wurden die Tiere jeder Versuchsreihe mit den für Mäuse pathogenen Parapoliomyelitis-Stamm Columbia SK oral infiziert. Den Mäusen wurde mit Hilfe einer Schlundsonde 0,25 ml des 10^{-2} verdünnten Infektionsmaterials zugeführt.

Die Infektionsdosis war so gewählt, daß annähernd eine Mortalität der Kontrolltiere von 50% erreicht wurde. Der Impferfolg wurde an der Mortalitätsdifferenz zwischen geimpften und nicht geimpften Versuchstieren am Ende des Versuches, also fünf Tage nach der Infektion, gemessen.

e) Nachweis neutralisierender Antikörper im Tierversuch

Hierzu wurden fünf Mäuse im täglichen Abstand fünf mal mit 0,25 ml Salk-Impfstoff, der zu gleichen Teilen mit physiologischer Na Cl-Lösung versetzt war, oral immunisiert. Eine weitere Gruppe von fünf Mäusen wurde in der gleichen Dosierung und im gleichen Rhythmus oral mit DMSO-Impfstoffgemisch geimpft. Fünf Tage nach der letzten Impfstoffgabe wurden die

immunisierten Mäuse und weitere fünf Kontrolltiere herzpunktiert. Die von jeweils fünf Mäusen gewonnenen Mischseren wurden in Zehnerpotenzen mit physiologischer Na Cl-Lösung bis 1:1000 verdünnt. Auf diese Seren wirkten Poliomyelitisviren des MEF₁ Stammes eine Stunde bei 37° Celsius ein. Der Stamm wurde an Mäusegehirnen angereichert, die zermörsert und mit physiologischer Na Cl-Lösung verdünnt wurden. Dieses zerriebene Hirnmaterial wurde in einer Konzentration von 10⁻² den Seren zugesetzt.

Mit 0,03 ml der verschieden verdünnten und vorbehandelten Seren wurden dann jeweils vier Mäuse intracerebral infiziert. Nach der eben beschriebenen Methode sind nacheinander vier Versuchsreihen mit insgesamt 192 Mäusen durchgeführt worden. Auf Antikörper konnte dann geschlossen werden, wenn nach der cerebralen Infektion mit infizierten Mischseren von immunisierten Mäusen die Zahl der gestorbenen oder an typischen Lähmungen erkrankten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren geringer war.

Aufschluß über die Quantität der Antikörper gaben die Infektionen mit verschieden verdünnten Mischseren. Da dem Verdünnungsgrad entsprechend die Zahl der Antikörper und damit auch das Neutralisierungsvermögen geringer war, mußte die Mortalität mit zunehmenden Verdünnungen größer werden.

II. Immunisierungsversuche am Menschen

a) Selbstversuche

An zehn aufeinander folgenden Tagen nahm ich morgens nüchtern jeweils 2 ml des Salk-Impfstoffes oral zu mir. Die Blutabnahmen erfolgten vor der Impfung (zur Null-Titer-Bestimmung), nach dem letzten Tag der Immunisierung und nach weiteren 10 Tagen.

Nach ungefähr einem halben Jahr wurde die Impfung im gleichen Rhythmus und gleicher Dosierung, aber mit einem an Antigengehalt ca. fünffach vermehrten Salk-Impfstoff wiederholt. Die Anreicherung des Impfstoffes mit inaktivierten Viren geschah mittels Ultrazentrifugation bei 20 000 Umdrehungen pro sec. während der Dauer von 2 Stunden.

b) Versuche an Kindern

Diese Versuche sind an Kindern der Städtischen Kinderklinik, Berlin-Charlottenburg (Direktor: Prof. Dr. Wiesener), durchgeführt worden. Dabei wurden fünf Kindern im Alter von 6 - 24 Monaten beiderlei Geschlechts der Salk-Impfstoff 10 Tage lang in einer täglichen Dosierung von 2 ml per os gegeben. Vor der Impfung wurde Blut zur Null-Titer-Bestimmung abgenommen. Am ersten und zehnten Tag nach der Immunisierung waren die weiteren Blutabnahmen. Die Serumproben von den vakzinierten Kindern wurden ge-

trennt gesammelt und bis zu ihrer Verwendung tiefgekühlt aufbewahrt.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde einer anderen Versuchsgruppe von fünf Kindern der nach dem oben angegebenen Verfahren angereicherte Impfstoff oral gegeben. Dosierung, Impfrhythmus und Blutabnahmen unterschieden sich nicht von der ersten Versuchsgruppe.

Alle Seren wurden im Neutralisationstest auf Antikörper gegen jeden der drei Poliomyelitistypen getrennt geprüft.

D. Ergebnisse

I. Tierversuche

Im Infektionsbelastungsversuch konnte an einem Tiermaterial von insgesamt 1032 Mäusen gezeigt werden, daß es möglich ist, die weiße Maus durch eine lokale Immunisierung mit Salk-Impfstoff gegen eine orale Infektion mit Columbia SK Viren zu schützen. Bei dieser Infektion erkrankten die Mäuse sonst regelmäßig in charakteristischer Weise und sterben.

Die Ergebnisse der 8 Versuchsreihen sind aus Tabelle 1 ersichtlich, eine Zusammenfassung aller Versuche aus Tabelle 2. Die prozentuale Sterblichkeit am Ende

aller Versuche ist aus Tabelle 2, Spalte 5 zu entnehmen. Hiernach liegt in allen Versuchen die Mortalitätsquote der Kontrolltiere höher als die der Immuntiere. Der höchste Wirkungsindex ^{*)} (Tabelle 2, Spalte 6) wurde bei der oralen Impfung erzielt. Er beträgt bei der Salk-Impfung, wie auch bei der Impfung mit dem DMSO-Impfstoffgemisch, 66,97, d.h., daß die Mortalität der Immuntiere ungefähr ein Drittel der Kontrolltiere beträgt. Diese Zahlenwerte sind nach der Methode von Koller (13) statistisch gesichert worden. Dabei ergibt sich eine Echtheit der Differenz von 1,93 (Tabelle 2, Spalte 9). Damit werden die Angaben von Raettig bestätigt, der in verschiedenen Modellversuchen einen Impfschutz nach oraler Gabe von nicht vermehrungsfähigen Viren erzielen konnte (18).

Bei der nasalen Impfung ist die Maus über ein Organ immunisiert worden, das nicht primär empfänglich für eine Poliomyelitisinfektion ist. Man muß allerdings annehmen, daß ein kleiner Teil der ohnehin geringen Antigendosis von der Maus verschluckt wurde, so daß die primär empfindliche Schleimhaut des Darmes doch in Kontakt mit inaktivierten Viren kam. Da diese verschluckte Antigenmenge jedoch im Verhältnis zu der bei der oralen Impfung verabreichten Menge sehr gering ist, ist es unwahrscheinlich, daß dadurch das Ergebnis beeinflusst wurde.

^{*)} $\text{Wirkungsindex} = \frac{b-a}{b} \cdot 100$

b = Mortalität der Kontrolltiere
a = Mortalität der Immuntiere

Tabelle 1

Ergebnisse der 8 nacheinander durchgeführten Versuchsreihen, bei denen Mäuse verschieden immunisiert und oral mit Parapoliomyelitis Viren infiziert wurden

Salk-Impfstoff										Salk-Impfstoff + DMSO										Kontrolle									
oral					nasal					rectal					oral					nasal					rectal				
Ver- such Nr.	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %	Zahl der Mäuse	dav. gest. %	in %					
1	10	2	20,0	22	3	13,6	18	2	11,1	16	0	0	21	11	52,4	21	3	14,3	16	7	43,8								
2	14	4	28,6	20	5	25,0	16	6	37,5	14	2	14,3	20	7	35,0	6	2	33,3	15	9	60,0								
3	15	3	20,0	19	5	26,3	18	9	50,0	17	6	35,2	20	9	45,0	25	10	40,0	16	9	56,3								
4	10	2	20,0	16	5	31,3	18	3	16,1	11	2	18,2	12	7	58,4	16	5	31,3	19	10	52,6								
5	13	3	23,1	12	3	25,0	25	7	28,0	13	4	30,8	19	5	26,3	23	10	43,5	24	14	58,3								
6	22	2	9,1	19	4	21,1	20	5	25,0	17	2	11,8	22	8	36,4	24	9	37,5	23	11	47,8								
7	21	1	4,8	20	2	10,0	20	3	15,0	25	2	8,0	20	8	40,0	19	5	26,4	25	10	40,0								
8	25	5	20,0	24	6	25,0	21	4	19,1	17	4	23,5	25	12	48,0	23	11	47,8	24	13	54,2								

Tabelle 2 Zusammenfassung der Versuche mit verschiedenen Immunisierungsmethoden
gegen eine orale Infektion mit Parapoliomyelitis Viren, Columbia SK

Impfstoff	Applikation	Zahl d. Mäuse	davon gest.	Mortalität in %	Wirk- samkeit	beobachtete Differenz	größte zu- lässige Differenz	Reinheit der Differenz E = $\frac{Db}{Dz}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Salk	oral	130	22	16,92	66,97	34,3	17,7	1,93
Salk+DMSO	oral	130	22	16,92	66,97	34,3	17,7	1,93
Salk	nasal	152	33	21,71	57,62	29,5	17,1	1,72
Salk+DMSO	nasal	159	67	41,51	18,97	9,7	12,9	0,75
Salk	rectal	156	39	25,00	51,20	26,2	16,1	1,62
Salk+DMSO	rectal	157	55	35,03	31,62	16,2	14,4	1,12
Kontrolle		162	83	51,23				

Die Senkung der Mortalität bei nasaler Applikation des Salk-Impfstoffes ist statistisch mit einer Sicherheit der Differenz von 1,72 gesichert. Die erreichte Wirksamkeit von 57,2 besagt, daß die prozentuale Sterblichkeit der Kontrolltiere mehr als das Doppelte beträgt. Der Impferfolg war damit erwartungsgemäß geringer als bei oraler Applikation des Impfstoffes.

Einen sehr geringen Schutz besaßen die Mäuse, denen ein mit DMSO versetzter Impfstoff nasal verabfolgt wurde. Die Differenz der Endmortalitäten war minimal, und die Wirksamkeit von 18,9 lag innerhalb der statistischen Streuung. Mögliche Ursachen dieses enttäuschenden Ergebnisses werden weiter unten zusammenfassend diskutiert, denn auch bei der rektalen Applikation des DMSO-Impfstoffgemisches liegt die Wirksamkeit deutlich unter der rektalen Impfung, bei der kein DMSO verwandt wurde.

Der Mortalitätsunterschied zwischen rektal mit Salk-Impfstoff geimpften und nicht geimpften Tieren ist geringer als bei den oral oder nasal immunisierten Versuchsgruppen.

Der Ablauf der mit verschiedenen Applikationen durchgeführten Versuche ist in Abbildung 1 und Abbildung 2 vergleichend dargestellt. Dabei wurde die Endmortalität der Kontrollen gleich 100 gesetzt. In diesen Ab-

bildungen werden noch einmal die in der Tabelle 2 aufgeführten Wirksamkeiten bildlich aufgezeigt. In der 1. Abbildung sind die Immunisierungsversuche mit Salk-Impfstoff, in der 2., die mit dem DMSO versetzten Salk-Impfstoff aufgeführt.

Um einen raschen Überblick zu gewinnen, sind in der zusammenfassenden Tabelle 2 sowie in den beiden Abbildungen nur die Durchschnittswerte der Mortalität angegeben. Da extreme Ergebnisse diese deutlich verändern können und so die Gefahr einer falschen Beurteilung besteht, ist in Abbildung 3 die Beständigkeit der Wirksamkeiten graphisch dargestellt.

Bei der oralen Impfung mit Salk-Impfstoff liegen die Werte der Wirksamkeit bei allen acht Einzelversuchen dicht um den eingezeichneten Mittelwert. Diese Impfung schützte zwar genau so gut wie die orale mit DMSO, erstere war jedoch bedeutend zuverlässiger.

Insgesamt schwanken die Wirksamkeiten bei allen Versuchen mit DMSO stärker. Bei der nasalen Verabreichung des Impfstoffgemisches lag sogar in drei Versuchen die Mortalität der geimpften Tiere höher als die der nicht geimpften.

Der Zusatz von DMSO hat also gegenüber dem normalen Salk-Impfstoff keinen Anstieg der Immunität ergeben.

Abb. 1 Anstieg der Mortalität bei Immunisierung mit Salk-Impfstoff und nachfolgender Infektion mit Columbia SK-Viren

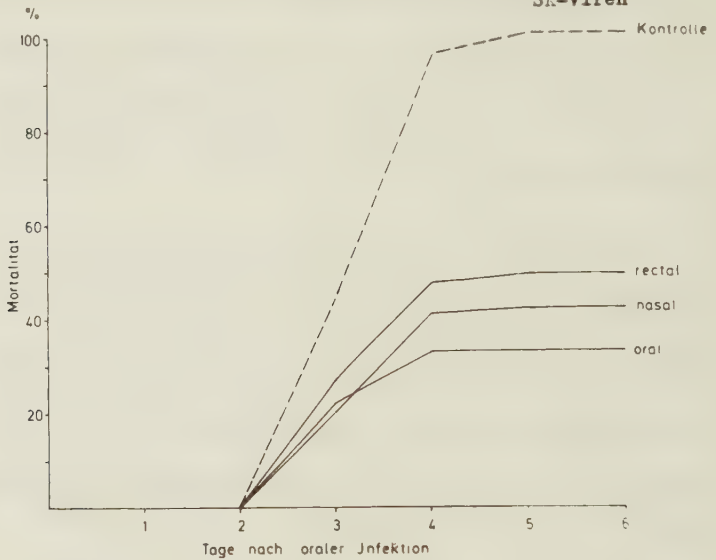
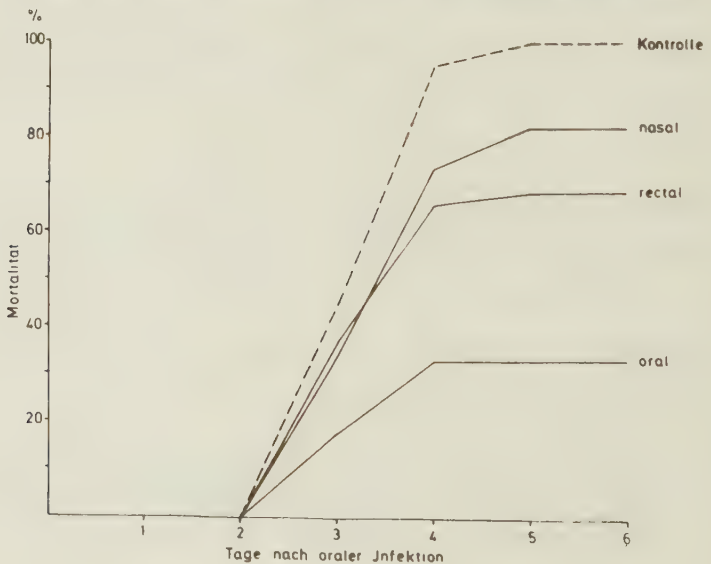


Abb. 2 Mortalitätsanstieg nach Immunisierung mit Salk-Impfstoff + DMSO und nachfolgender Infektion mit Columbia SK-Viren



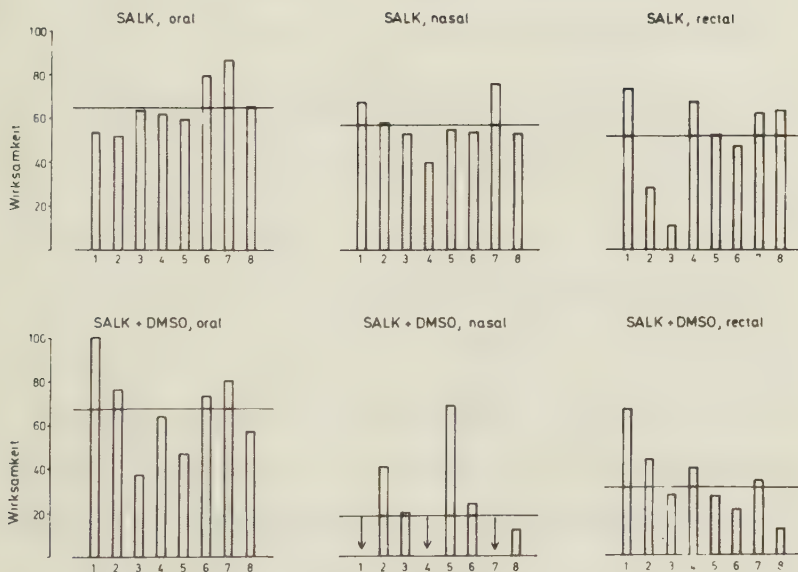


Abb. 3 Graphische Darstellung der Wirksamkeit in
8 Einzelversuchen

Bei der rektalen und nasalen Impfung waren die Tiere schlechter gegen die Infektion geschützt. Die Annahme, daß der Impferfolg durch erhöhte Resorption des Antigens unter dem Einfluß von DMSO ansteigt, wurde durch diese Versuche nicht bestätigt.

Die Befunde widersprechen allerdings den Ergebnissen, die Tschoepe bei Tierversuchen mit Kaninchen erzielte. Sie hat die Tiere nasal, kutan und parenteral mit hitzeinaktiviertem Impfstoff von *S. typhi murium* allein oder mit dem Zusatz von DMSO immunisiert. Der Impferfolg wurde am Titeranstieg agglutinierender Antikörper gemessen. Dabei zeigte sich, daß der Antikörpertiter bei den mit dem DMSO-Zusatz geimpften Tieren schneller und höher stieg als bei den ohne DMSO geimpften. Die bessere Schutzwirkung des DMSO-Impfgemisches wurde auch nach intrakutaner Infektionsbelastung deutlich. Die lokalen Reaktionen und der Anstieg der Körpertemperatur war geringer als bei den Kontrolltieren (29).

Im folgenden seien einige mögliche Ursachen diskutiert, die die schlechten Ergebnisse meiner Versuche mit DMSO erklären können. Ganz offensichtlich beantworten Mäuse die Aufnahme hochprozentiger DMSO-Lösungen mit einer starken Allgemeinreaktion. In Vorversuchen, in denen eine 90%ige Lösung statt der später verwendeten 30%igen Lösung verabreicht wurde, starben zahlreiche Tiere,

einige unter heftigen tonisch-klonischen Krämpfen.

Schon wenige Minuten nach der Impfung wurde das Fell der Tiere durch Schwitzen struppig und feucht. Viele waren äußerst unruhig und sprangen wild im Käfig umher. Andere lagen apathisch mit vertiefter Atmung da. Ganz ähnliche Beobachtungen beschreibt H.J.Mallach (15).

Er konnte nach längerer Einwirkung von DMSO außerdem eine erhöhte Erregbarkeit auf optische und akustische Reize feststellen.

Jacob gibt die LD₅₀ für eine einmalige orale Verabfolgung von hundert prozentigem DMSO zwischen 16,5 g/kg und 21,4 g/kg an (10). Die Tiere meiner Versuchsreihe erhielten 12,5 g/kg einer dreißig prozentigen Lösung; das entspricht einer Dosis von 4,125 g/kg einer hundert prozentigen DMSO-Lösung, also ungefähr dem fünften Teil der LD₅₀. Diese Menge wurde über fünf Tage oral gegeben und gut vertragen. Mit einer Überdosierung ist die hohe Mortalitätsquote der nasal und rektal mit dem DMSO-Impfstoffgemisch geimpften Mäuse also nicht zu erklären. Würde die Antigeneigenschaft des Impfstoffes durch DMSO geschädigt, dann müßte das auch bei der oralen Impfung in Erscheinung treten. Diese war jedoch sehr erfolgreich +). Aus gleichem Grund erscheint die Überlegung unwahrscheinlich, die eine Schädigung des Darmepithels

+)Vergleiche auch die weitere Diskussion über die Wirkung des DMSO auf das Antigen bei den Ausführungen über den Nachweis neutralisierender Antikörper (Seite 26).

und damit eine geringere lokale Immunität bzw. ein ungehemmtes Eindringen der virulenten Viren nach oraler Infektion annimmt.

Eine andere Erklärung bietet sich aus den Versuchsergebnissen des Antikörpernachweises an. Danach konnte, wie unten ausführlich beschrieben werden soll, bei den mit Salk-Impfstoff immunisierten Mäusen eine Antikörperbildung angenommen werden, bei den Mäusen, die den Impfstoff mit DMSO bekamen, jedoch nicht. Wenn man annimmt, daß der Schutz nach einer nasalen Impfung nicht auf einer lokalen Immunität des Darmes beruht, wie bei einer oralen oder rektalen Impfung, sondern vielmehr eine humorale Immunität darstellt, wird die hohe Sterblichkeit bei dieser Impfmethode verständlich.

Günzel und Richter konnten bei Ratten schon nach Gabe von 5,5 g/kg einer hundert prozentigen DMSO-Lösung eine Abnahme der Leucocytenzahl und eine Verschiebung von Granulocyten zu Leucocyten zugunsten der ersteren feststellen (4). Sie beobachteten bei dieser und noch höherer Dosierung außerdem Milzfollikelatrophien, Entzündungen des Dünndarms und Erosionen der Magenschleimhaut.

Um weiteren Aufschluß über die Wirkung von DMSO zu erhalten, führte Raettig Tierversuche durch, in denen Mäuse nach Verfütterung von DMSO oral mit *S. typhi* murium infiziert wurden. Dabei zeigten die mit DMSO be-

handelten Tiere bei genügend hoher Dosierung eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der oralen Infektion als die nicht mit DMSO vorbehandelte Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung dieser allerdings statistisch noch nicht gesicherten Befunde wäre nach Raettig eine Reizung an der Darmschleimhaut durch das DMSO, die eine Erhöhung der unspezifischen Abwehr verursachen könnte (25).

Die Mortalitätssenkung nach Columbia SK Infektion wurde durch eine unspezifische Impfung mit trivalentem Salk-Impfstoff erreicht. Schon Raettig konnte am Modell der Columbia SK Infektion der Maus, wie oben erwähnt, zeigen, daß nicht nur eine spezifische orale Impfung schützt, sondern daß die Abwehr des Darmes auch durch eine unspezifische Impfung erhöht werden kann. Um den Einwand zu entkräften, daß Impfstoffzusätze, wie zum Beispiel Bestandteile der Gewebekultur, die Reaktionsweise des Darmepithels gegenüber der Infektion modifiziert haben, setzte Raettig einen Leerversuch an. Er verimpfte oral einen Leerimpfstoff, in dem die inaktivierten Poliomyelitisviren weggelassen waren, der sonst aber die gleiche Zusammensetzung wie der kommerzielle Salk-Impfstoff besaß. Da nach der Infektion die Mortalitätsrate der Kontrolltiere ungefähr gleich hoch war, konnte man annehmen, daß die inaktivierten Poliomyelitisviren die antigenwirksamen Substanzen darstellen (18).

Die Frage, inwieweit die unspezifische orale Immunisierung auf Antigengemeinschaften zwischen Impf- und Infektionsviren zurückzuführen ist, oder ob völlig unspezifische Reaktionen dafür verantwortlich zu machen sind, hat Raettig an einem Modellversuch weiterverfolgt. So konnte er bei Mäusen nachweisen, daß auch eine völlig erreger-unspezifische orale Immunisierung mit inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien gegenüber einer oralen Infektion mit virulenten Columbia SK Viren zu schützen vermag (18).

Der Infektionsschutz nach lokaler Immunisierung mit inaktivierten Viren läßt sich mit Hilfe des Interferenzmechanismus erklären. Dabei hemmt ein Virus das andere in seiner Vermehrung. Die sich dabei abspielenden Vorgänge blieben lange Zeit unbekannt. Erst 1957 konnten Isaacs und Lindeman zeigen, daß die Interferenz bei Influenza Viren durch einen Faktor vermittelt wird, den sie als Interferon bezeichneten (7,8). Dabei handelt es sich um einen in der Zelle gebildeten Eiweißkomplex, der auf Viruseinwirkung hin entsteht (9).

Auch bei anderen Viren und Bakterien, sogar nach Inaktivierung derselben, ist die Bildung von Interferon oder interferonähnlichen Faktoren beobachtet worden. Da diese unspezifisch wirken, könnte die Infektionsabwehr dadurch verursacht worden sein, daß nach dem Kontakt der

inaktivierten Impfviren mit dem Darmpithel interferon-ähnliche Substanzen in das Darmlumen abgegeben worden sind (12,28).

II. Antikörper

Weiteren Aufschluß über eine lokale Impfung mit inaktivierten Viren ergibt die Prüfung der Antikörper. Mischseren von immunisierten Mäusen wurden dazu im Neutralisationstest am Tier geprüft. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Eine graphische Darstellung der Neutralisationsversuche, die die Abhängigkeit der Anzahl der gelähmten oder gestorbenen Tiere von den zur Infektion benutzten Serumverdünnungen zeigt, enthält Abbildung 4.

Aus dieser ist zu entnehmen, daß der Antikörpertiter in dem unverdünnten wie auch in dem 1:10 verdünnten Serum der mit Salk-Impfstoff immunisierten Mäuse ausreichte, um den prozentualen Anteil der an typischen Lähmungen erkrankten Mäuse oder die Sterbefälle im Vergleich zu den Kontrolltieren erheblich zu senken.

Eine orale Impfung mit inaktivierten Poliomyelitisviren führt demnach zu einer gewissen humoralen Immunität. Nach den von Raettig durchgeführten Versuchen zur Durchlässigkeit des Darmtraktes für Viren kann man annehmen, daß ein Teil der bei der Impfung aufgenommenen Viren in die Blutbahn gelangte und dort antigen wirksam wurde.

Tabelle 2 Ergebnisse des Neutralisationstests im Tierversuch

1	2	Salk-Impfstoff			Salk-Impfstoff + DMSO			Kontrolle	
		3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnung	Zahl d. Mäuse	Zahl d. Gelähmt. u. gest.	in %	Wirk-samkeit	Zahl d. Gelähmt. u. gest.	in %	wirk-samkeit	Zahl d. Gelähmt. u. gest.	in %
unverd.	16	1	6,25	92,3	11	68,75	15,38	13	81,25
1:10	16	3	18,75	70,0	8	50,00	20,00	10	62,50
1:100	16	5	31,25	50,0	7	43,75	30,00	10	62,50
1:1000	16	12	75,00		6	37,50	40,00	10	62,50

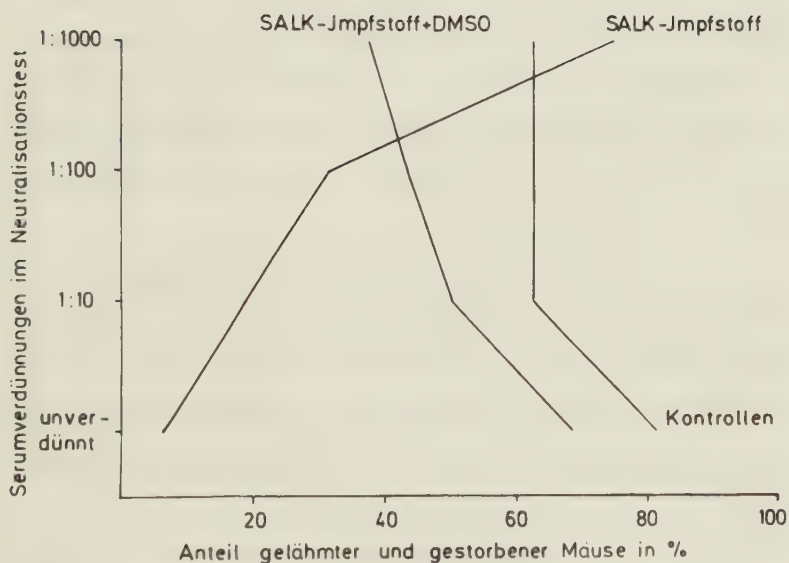


Abb. 4

Morbidität und Mortalität in Abhängigkeit von
den Serumverdünnungen

Eine große Sterblichkeit und eine hohe Anzahl von gelähmten Tieren trat nach der Infektion mit vorbehandelten Seren von Mäusen auf, die mit dem DMSO versetzten Salk-Impfstoff immunisiert worden waren. Die entsprechende Kurve in Abbildung 4 liegt dicht unter der der Kontrolltiere. Daraus ist zu schließen, daß das DMSO entweder eine Antikörperbildung durch Störung der Immunreaktion verhindert hat, oder daß das Antigen geschädigt und unwirksam geworden ist.

Um diese Frage zu klären, haben Raettig und Mitarbeiter einige tierexperimentelle Versuche in dieser Richtung unternommen. Nach diesen Ergebnissen darf man annehmen, daß der mangelhafte Schutz nach Gabe des DMSO-Impfstoffgemisches durch Schädigung des Antigens bedingt worden ist (25). Raettig versetzte zu einer 90% DMSO-Lösung die gleiche Menge einer lebenden *S. typhi murium*-Kultur. Nach 48 Stunden erhielt man einen sterilen DMSO-Vollantigen-Impfstoff, aus dem anschließend der DMSO-Gehalt auf 3 - 5% reduziert wurde. Dieser oral verabfolgte Impfstoff zeigte bei Mäusen gegenüber einer oralen Infektion mit *S. typhi murium* keine Schutzwirkung; das Breslau-Antigen wurde also nach zweitägiger Einwirkung von DMSO in der Art geschädigt, daß die antigene Wirkung aufgehoben wurde.

Hier scheint ein offensichtlicher Widerspruch zu meinen Ergebnissen vorzuliegen, bei denen nach oraler Immunisierung mit dem DMSO-Impfstoffgemisch und anschließen-

der Infektion mit Columbia SK Viren ein guter Impferfolg erzielt werden konnte. Bedenkt man aber, daß Raettig die Unwirksamkeit des Antigens auf die 2 tägige Einwirkung des DMSO zurückführt, meine Versuchsgruppe aber mit einem frisch angesetzten DMSO-Impfstoffgemisch immunisiert worden ist, so lassen sich die widersprechenden Wirkungen des DMSO durch die unterschiedliche Länge der Einwirkungszeit erklären.

III. Immunisierungsversuche am Menschen

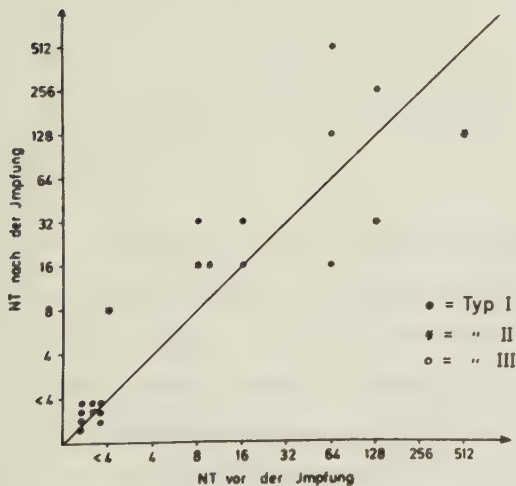
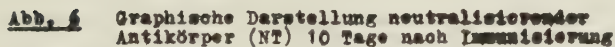
In diesen Versuchen ist geprüft worden, ob die orale Gabe von inaktivierten Poliomyelitisviren beim Menschen die Antikörpertiter im strömenden Blut nach oraler Impfung erhöhen kann. Da bei einer parenteralen Impfung primär die humorale Immunität stimuliert wird, ist der Rückschluß statthaft, daß ein Antigen, das nicht oder nur zu einer geringen Antikörperreaktion geführt hat, wenig wirksam ist. Bei der oralen Impfung dagegen wird die humorale Immunität nicht primär, sondern erst sekundär und nicht notwendigerweise angesprochen. Bei dieser Impfmethode wird zuerst die Schleimhaut des Darms in ihrer Abwehr gestärkt. Antikörper werden nur dann gebildet, wenn genügend Antigenmengen die Schleimhaut durchdringen und in die Blutbahn gelangen (16).

Die Frage der Antikörperbildung nach oraler Impfung ist zuerst im Selbstversuch geprüft worden. Der Salk-Impf-

stoff wurde von mir gut vertragen und führte zu keinerlei Beschwerden. Die Antikörper wurden im Neutralisationstest ermittelt. Dabei zeigte sich, daß der Titer gegen den Typ II am ersten Tag nach der 10 täglichen Immunisierung um eine Stufe von 8 auf 16 anstieg. Nach weiteren 10 Tagen verdoppelten sich auch die Titer gegen Typ I von 128 auf 256 und für Typ III erhöhten sie sich um zwei Stufen von 8 auf 32.

Die Antikörperbildung stellt somit ein Indiz dafür dar, daß der humorale Abwehrmechanismus auf den Antigenreiz mit einer Antikörperbildung reagiert hat. Dies setzt voraus, daß die inaktivierten Viren die Darmwand passierten und über die Lymphwege in die Blutbahn gelangten, ohne daß durch fermentative Abbauprozesse die Antigenität des Impfstoffes aufgehoben wurde.

An sechs Kindern sind entsprechende Versuche durchgeführt worden. Impfrhythmus und Dosierung wurden beibehalten. Die gegen jeden der drei Typen getrennt ermittelten Antikörper-Titer sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 zusammenfassend dargestellt. Dabei liegen die praevaccinalen Werte auf der Abszisse und die nach der Impfung ermittelten Titer auf der Ordinate. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse des Neutralisationstestes am ersten Tag nach der Immunisierung und Abbildung 6



die Titer nach weiteren 10 Tagen. Wie aus der ersten graphischen Darstellung zu entnehmen ist, liegen vier Titerwerte über und vier unter den praevaccinalen Werten. Gegen Typ III ist die Antikörperbildung um vier Titerstufen angestiegen. Erst 10 Tage nach der Immunisierung läßt sich ein Anstieg der Antikörper erkennen. Wie Abbildung 6 zeigt, liegen acht Werte über den praevaccinalen.

Aus beiden Abbildungen ist die Besonderheit zu entnehmen, daß bei den Kindern, die vor der Impfung noch keine Antikörper besaßen -mit einer Ausnahme- auch nach der Impfung keine nachweisbar waren. Damit wird die Beobachtung von Salk bestätigt, der feststellte, daß Probanden, die bereits Antikörper gegen wenigstens einen Typ besitzen, besser mit der Bildung von Antikörpern reagieren als jene, die als Ausdruck eines noch nie durchgemachten Kontaktes noch keine Antikörper gebildet hatten (26).

Bei den eben beschriebenen Versuchen wurde eine Dosis verwendet, die das Siebenfache der Antigenmenge enthält, die bei parenteraler Salk-Impfung gewöhnlich appliziert wird. Für eine orale Immunisierung ist diese Menge dennoch äußerst gering, da nur ein Teil davon zur Resorption in die Blutbahn gelangt. Für die weiteren Versuche wurde deshalb eine höhere Dosierung gewählt.

An fünf Kindern wie auch in dem vorangegangenen Selbstversuch wurde eine ungefähr fünfunddreißig mal höhere Antigenmenge als bei der parenteralen Poliomyelitisimpfung nach Salk geimpft. Um bei den Kleinkindern die Darreichung zu erleichtern, ist der kommerzielle Impfstoff so eingeengt worden, daß er ca. die fünffache Antigenmenge enthielt. Auch dieser angereicherte Impfstoff wurde von allen Probanden gut vertragen.

Die im Neutralisationsversuch ermittelten Antikörper zeigt Abbildung 7 und 8, wobei in der ersten Abbildung die Titer vom ersten Tag und in der zweiten Abbildung die Werte vom zehnten Tag nach der Immunisierung enthalten sind. +)

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich, daß diejenigen Kinder keine Antikörper bildeten, bei denen schon vor der Impfung keine nachzuweisen waren. Allerdings konnte in dieser Versuchsreihe auch bei den übrigen Kindern nur zum Teil Antikörperanstieg festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren enttäuschend. Es ist möglich, daß die inaktivierten Viren durch die Ultrazentrifugation bei der Einengung des Salk-Impfstoffes in ihrer Antigeneigenschaft geschädigt wurden. Es sollten deshalb weitere Versuche mit hoher Antigendosis durchgeführt werden. Optimale Antigenmengen und Intervalle der Blutabnahmen wären zu erproben.

+) Ein Proband stand für die 2. Antikörperbestimmung nicht mehr zur Verfügung.

Abb. 7 Graphische Darstellung neutralisierender Antikörper (NT) am 1. Tag nach Immunisierung mit eingeengtem Salk-Impfstoff

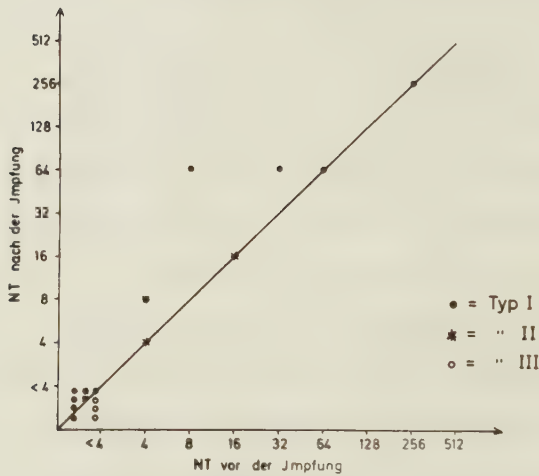
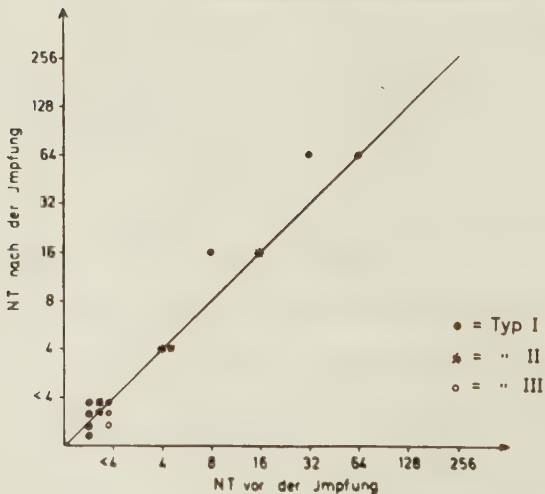


Abb. 8 Graphische Darstellung neutralisierender Antikörper (NT) 10 Tage nach Immunisierung mit eingeengtem Salk-Impfstoff



E. Vorteile einer oralen Impfung mit inaktivierten Viren

Die orale Impfung mit inaktivierten Poliomyelitis Viren gewinnt neben der grundsätzlichen Bedeutung auch deshalb besonderes Interesse, da beim Menschen mit Hypo- oder Agammaglobulinämie eine parenteral durchgeführte Impfung nach Salk nicht zu einer humoralen Immunität führt, die die Infektion verhindert. Eine Schluckimpfung mit vermehrungsfähigen Viren ist bei diesen Personen selbstverständlich kontraindiziert. Durch die Impfviren können solche Personen eine typische zyklische Infektionskrankheit mit Lähmungen als Organmanifestation erleiden (21). Eine orale Impfung mit nicht vermehrungsfähigen Viren, die zur Ausbildung einer lokalen Immunität des Darmes führen würde, würde eine neue Möglichkeit darstellen, diese Personen gegen eine Poliomyelitis Infektion zu schützen.

Die wichtigste Voraussetzung für die orale Anwendung von "Lebend-Impfstoffen" besteht darin, daß die Eigenschaften der Avirulenz stabil bleiben (27). Eventuell auftretende Schwierigkeiten bei der Virulenzabschwächung vermehrungsfähiger Viren könnte man mit dieser Impfmethode bei späteren Impfstoffherstellungen umgehen. Auch die Sorge um eine hohe Spezifität würde entfallen, denn nach den Angaben verschiedener Autoren, wie auch in den hier durchgeführten Immunisierungsversuchen bei Mäusen ist die Immunität des Darmes nach lokaler Impfung nicht streng erregerspezifisch (11,18).

Nach den von Raettig durchgeführten Versuchen zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Viren muß man bei einer "Lebend-Impfung" die Gefahr einer Überdosierung in Betracht ziehen. Da die Viren ohne pathogenetische Vorgänge die Darmwand einfach passieren, kann nach einer Überdosierung virulenzabgeschwächter Erreger der Impfling Schaden erleiden. Während einer Stress-Situation oder einer Cortisonbehandlung ist der Impfling besonders gefährdet. Auch einer spezifischen und unspezifischen Provokation latenter Infektionen oder einer in der Inkubationszeit befindlichen Infektionskrankheit kann dadurch Vorschub geleistet werden (21).

Weiterhin haben Raettig und Mitarbeiter in verschiedenen Tierversuchen bewiesen, daß eine parenterale Impfung mit inaktivierten Antigenen von Bakterien oder Viren, die während der Inkubationszeit einer Infektionskrankheit durchgeführt wird, zu einer Provokation derselben führen kann (22). Dabei wird die Inkubationszeit verkürzt und der Verlauf der sich entwickelnden Krankheit verschlimmert, kenntlich an dem Anstieg der Todesfälle. Bei oraler Anwendung von nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen konnte dagegen eine Provokation der in der Inkubationszeit befindlichen Infektionskrankheiten nicht beobachtet werden (23).

Auf die epidemiologische Praxis übertragen, ergeben sich daraus folgende Konsequenzen: In Bevölkerungsgruppen mit

einer hohen epidemischen Ausbreitung einer Infektionskrankheit oder in Katastrophengebieten ist die parenterale Antigen-Injektion als Erstimpfung nicht angezeigt. Als Methode der Wahl empfiehlt sich deshalb die orale Impfung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen (24). Da es dabei keine Kontraindikationen gibt und keine Provokationen zu befürchten sind, ist eine hochgradige Durchimpfung der Bevölkerung möglich. In einem Katastrophengebiet brauchte diese orale Impfung nicht von Ärzten durchgeführt zu werden. Wegen dieser Vorteile erscheint es lohnend, weiter die Grundlagen dieser Form der Immunprophylaxe zu erforschen und die praktische Durchführbarkeit zu entwickeln.

F. Zusammenfassung

- I. Die Mortalität der weißen Maus nach oraler Infektion mit Columbia SK Viren konnte durch eine unspezifische orale Immunisierung mit inaktivierten Poliomyelitis Viren statistisch signifikant gesenkt werden. Auch die rektale und nasale Applikation des Impfstoffes erhöhte die Abwehr gegenüber der Infektion.
- II. Der Zusatz einer 30-prozentigen DMSO-Lösung zum Salk-Impfstoff, der zu einer Zunahme der resorbierten Antigenmenge führen sollte, konnte bei oraler Immunisierung

den Infektionsschutz nicht ernöhen. Nach rektaler bzw. nach nasaler Impfung mit dem DMSO-Impfstoffgemisch war die Mortalität der Mäuse höher als bei entsprechenden Versuchen ohne DMSO-Zusatz. Mögliche Ursachen einer durch DMSO bedingten Verminderung der Immunität sind diskutiert worden.

- III. Im Serum oral mit Salk-Impfstoff geimpfter Mäuse konnten im Tierversuch neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Auf Grund der Mortalitätsrate von Mäusen, denen intracerebral ein Gemisch aus Serum immunisierter Mäuse und virulentes Poliomyelitisvirus verimpft wurde, konnte gezeigt werden, daß Antikörper gebildet worden waren. Aus der gleichen Versuchsanordnung ergab sich, daß die mit dem DMSO-Impfstoffgemisch geimpften Mäuse keine Antikörper gebildet hatten.
- IV. Auch beim Menschen wurde geprüft, ob eine orale Impfung mit nicht vermehrungsfähigen Poliomyelitisviren eine Antikörperbildung induzieren kann. In den meisten der zehn Tage nach der Impfung untersuchten Seren ließ sich eine nur wenige Titerstufen ausmachende Antikörperbildung nachweisen. Nach oraler Gabe von einem durch Ultrazentrifugation an Antigenen angereicherten Salk-Impfstoff konnte keine Bildung von Antikörpern festgestellt werden.

Literatur

- 1) Besredka, A.: "Die lokale Immunisierung", Leipzig, A. Barth, 1926
- 2) Ehrlich, F.: "Experimentelle Untersuchungen über Immunität", Dtsch. Med. Nachr. 976 und 1218 (1891)
- 3) ders.: "Historisches zur Frage der Immunisierung per os", Wien, Klin. Wschr. 1908 I, S. 652
- 4) Güntzel, P., und Richter, K.D.: "Verträglichkeit von Dolicur bei langdauernder Anwendung im Tierversuch", Schering-DMSO-Symposium, Berlin 1965, S. 23
- 5) Herbst, G.: "Das Lymphsystem und seine Verrichtungen", Göttingen 1844, S. 333
- 6) Hoffmann, M.: "Resorptionsvirämie nach oraler, trachealer und rektaler Gabe des T₂-Phagen und die Bedeutung der Polyelektrolyte für ihr Zustandekommen", Zbl. f. Bakt. I. Orig. 198, S. 371-390 (1965)
- 7) Isaacs, A.: "Nature and Function of Interferon" in: Morris Pollard (ed): Perspectives in Virology, S. 117
- 8) ders. u. Lindemann, J.: "Virus Interference: "I. The Interferon", Proc. Roy. Soc. B 147, S. 258 (1957)
- 9) ders. u. Klemperer, H.G., u. Hitchcock, G.: "Studies on the Mechanism of Action of Interferon", Virologie 13, Nr. 2, S. 191-199 (1961)
- 10) Jacob, St. W.: "Zur Pharmakologie und Toxikologie des Dimethylsulfoxyds", Schering-DMSO-Symposium, Bln. 1965, S. 1-12
- 11) Jandl, G.: "Experimentelle Untersuchung zum Mechanismus der oralen Typhus-Immunisierung", Ztschr. f. Hygiene 151, S. 34-44 (1965)

- 12) Youngner, J.S., u. Stinebring, W.R.: "Interferon Production in Chickens injected with Brucella abortus", Science Vol. 144 Nr. 3621, S. 1022-1023 (1964)
- 13) Koller, S.: "Graph. Tafeln z. Beurteilung statist. Zahlen", Dresden, Leipzig 1940
- 14) Löffler, F.: "Über Immunisierung per os" in: v. Leuthold. Gedenkschrift I. S. 247 (1906)
- 15) Mallach, H.J.: "Gemeinsame Wirkung von Aethyl-alkohol und Dolicur", Schering-DMSO-Symposium, Bln. 1965, S. 27
- 16) Raettig, H.: "Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 193, S. 398 (1964)
- 17) ders.: "Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr)", Zbl.f.Bakt. I. Ref. 183 427-480 (1962)
- 18) ders.: "Neue Modellversuche zur Infekt-abwehr des Darmes", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 198, S. 206-211 (1965)
- 19) ders.: "Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 191, S. 97-103 (1963)
- 20) ders.: "Tierexperimente zur Resorptions-virämie", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 192, S. 534-538 (1964)
- 21) ders.: "Indikationen und Kontraindikationen bei aktiven Schutzimpfungen", Internist 7, Heft 2, S. 65-70 (1966)
- 22) ders.: "Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 201, S. 253-266 (1966)
- 23) ders.: "Vermeidung der Provokation einer Virusinfektion durch orale Impfung mit inaktivierten Viren während der Inkubationszeit", Zbl.f.Bakt. I. Orig. 200, S. 448, 459 (1966)

- 24) Raettig, H.: "Epidemiologische Erfahrungen und Pläne", Münchner Med. Wochenschr. 18, S. 934 (1963)
- 25) ders.: "Möglichkeiten d. DMSO in der experimentellen Immunologie", DMSO-Symposium Wien 1966, S. 51-57
- 26) Salk, J. E. "Studien mit nicht mehr infektiösen Poliomyelitis-Vaccinen", III. Intern. Poliomyelitis-Kongreß vom 6. 10. Sept. 1954 in: Behring-Mitt. (1964)
- 27) Siegert, R.: "Probleme der Lebendimpfung gegen Viruskrankheiten des Menschen", Zbl. f. Bakt. I. Orig. 191, S. 21 (1963)
- 28) Stinebring, W. R., u. Yougner, J. S.: "Patterns of Interferon Appearance in Mice injected with Bacteria of Bacterial Endotoxin", Nature Vol. 204 Nr. 4959, 3. 712 (1964)
- 29) Eschoepe, M.: "Vergleichende lokale Immunisierung mit inaktivierten S. typhi murium-Bakterien unter Einfluß von DMSO", Zbl. f. Bakt. I. Ref. 204, S. 187 (1966)
- 30) Volkheimer, G.: "Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente", Z. Gastroenterologie 2, S. 57 (1964)
- 31) ders.: "Über Resorption und Ausscheidung von intakten Hefezellen", Zbl. f. Bakt. I. Orig. 192, S. 121 (1964)
- 32) Conolly, J. H., Dick, G. W. und Corkin, D. L.: "Antibody Response Following Intradermal Or Oral Administration Of Formalinised Poliomyelitis Vaccine" Lancet II S. 333 (1958)

Herrn Prof.Dr.med.H.Raettig möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die liebenswürdige Unterstützung bei der Arbeit danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof.Dr.med.H.Wiesener, Direktor der Städtischen Kinderklinik Charlottenburg, für die Möglichkeit, Immunisierungsversuche an Kindern seiner Klinik durchführen zu können, Frau Dr.L.Grützner für die Einführung in die Methode der Virus-Neutralisation, den Behring-Werken, Marburg, für die Bereitstellung des Salk-Impfstoffes und der Firma Schering A.G. für die Bereitstellung des DMSO. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung im Robert Koch-Institut bedanken, besonders bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau B.Uecker.

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Martin Neumann wurde ich am 30.6.1942 in Berlin geboren.

Nach 6-jähriger Grundschulzeit besuchte ich die Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Grunewald, wo ich 1961 die Reifeprüfung bestand. Anschließend wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Nach 12 Semester Medizinstudium legte ich im Herbst 1967 das Staatsexamen an der Freien Universität Berlin ab.

Als Medizinalassistent arbeite ich seit November 1967 auf der chirurgischen Abteilung des Bethanien-Krankenhauses Berlin-Kreuzberg.

